

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **11196887 A**

(43) Date of publication of application: **27 . 07 . 99**

(51) Int. Cl

**C12P 7/40
C12N 1/21
C12N 15/09
//(C12P 7/40 , C12R 1:13), (C12N
1/21 , C12R 1:13), (C12N 15/09 ,
C12R 1:13)**

(21) Application number: **10020360**

(22) Date of filing: **16 . 01 . 98**

(71) Applicant: **MITSUBISHI CHEMICAL CORP**

(72) Inventor: **KOBAYASHI MIKI
GOTO MAKOTO
TERASAWA MASATO
YUGAWA HIDEAKI**

(54) **PRODUCTION OF ORGANIC ACID BY
PHOSPHOENOLPYRUVIC ACID CARBOXYLASE
GENE RECOMBINANT MICROBE**

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain an organic acid in a high yield by effecting aerobic Coryne type bacteria recombined with a phosphoenolpyruvic acid carboxylase gene anaerobically to an organic material in a solution containing (bi)carbonate ion, CO₂, or the like.

SOLUTION: The method for producing an organic acid

comprises effecting an aerobic Coryne type bacterium (e.g. *Brevibacterium flavum*) recombined with a phosphoenolpyruvic acid carboxylase gene originated from a microorganism such as *Rhodopseudomonas paulustris* and *Brevibacterium flavum* or a plant such as a soybean and a corn, or their preparations anaerobically to an organic material in a solution containing (bi)carbonate ion, CO₂, or the like, to produce an organic acid such as succinic acid in a high efficiency and a high yield.

COPYRIGHT: (C)1999,JPO

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平11-196887

(43)公開日 平成11年(1999)7月27日

(51)Int.Cl.⁶
C 12 P 7/40
C 12 N 1/21
15/09 ZNA
// (C 12 P 7/40
C 12 R 1:13)

識別記号

F I
C 12 P 7/40
C 12 N 1/21
15/00 ZNAA

審査請求 未請求 請求項の数 6 FD (全 18 頁) 最終頁に統ぐ

(21)出願番号 特願平10-20360

(71)出願人 000005968

三菱化学株式会社

東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

(22)出願日 平成10年(1998)1月16日

(72)発明者 小林 幹

茨城県稻敷郡阿見町中央八丁目3番1号

三菱化学株式会社筑波研究所内

(72)発明者 後藤 誠

茨城県稻敷郡阿見町中央八丁目3番1号

三菱化学株式会社筑波研究所内

(72)発明者 寺沢 真人

茨城県稻敷郡阿見町中央八丁目3番1号

三菱化学株式会社筑波研究所内

(74)代理人 弁理士 今村 正純 (外1名)

最終頁に統ぐ

(54)【発明の名称】 ホスホエノールビルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子組み換え菌体による有機酸の製造法

(57)【要約】

【課題】 P E P C 遺伝子で組み換えた好気性コリネ型細菌を用いた培養法あるいは酵素法により、効率よく、かつ 高収率でコハク酸等の有機酸を製造する方法を提供する。

【解決手段】 P E P C 遺伝子で組み換えた好気性コリネ型細菌あるいはその調製物を、炭酸イオンもしくは重炭酸イオンまたは二酸化炭素ガスを含有する反応液中で嫌気的に有機原料に作用させることを特徴とする有機酸の製造方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子で組み換えた好気性コリネ型細菌あるいはその調製物を、炭酸イオンもしくは重炭酸イオンまたは二酸化炭素ガスを含有する反応液中で嫌気的に有機原料に作用させ、有機酸を生成させることを特徴とする有機酸の製造方法。

【請求項2】 炭酸もしくは重炭酸またはそれらの塩を反応液に添加すること、または反応液に二酸化炭素ガスを供給することにより、炭酸イオンもしくは重炭酸イオンまたは二酸化炭素ガスを反応液に含有させる請求項1記載の方法。

【請求項3】 ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子が、微生物または植物由来である請求項1または2記載の方法。

【請求項4】 ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子が、ロドシュードモナス・パルストリス (*Rhodopseudomonas palustris*)、ブレビバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*)、ストレプトマイセス・コエリカラー (*Streptomyces coelicolor*)、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、アナベナ・バリアビリス (*Anabaena variabilis*)、アナシクティス・ニジュランス (*Anacystis nidulans*)、フラベリア・アウストララシカ (*Flaveria australasica*)、フラベリア・プリングレイ (*Flaveria pringlei*)、フラベリア・トリネビア (*Flaveria trinervia*)、アロエ・アルボレスセンス (*Aloe arborescens*)、ブライカ・ナップス (*Brassica napus*)、ソラヌム・ツベロサム (*Solanum tuberosum*)、メセムブリアンセサム・クリスタリウム (*Mesembryanthemum crystallinum*)、ソルガム・ブルガレ (*Sorghum vulgare*)、ニコチアナ・タバコム (*Nicotiana tabacum*)、ダイズ又はトウモロコシ由来の遺伝子である請求項3記載の方法。

【請求項5】 好気性コリネ型細菌が、ブレビバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*) である請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】 ブレビバクテリウム・フラバムが、ブレビバクテリウム・フラバム MJ-233-AB-41である請求項5記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子で組み換えた好気性コリネ型細菌またはその調製物を用いた有機酸の製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ（以下これを「P E P C」と略称することがある）は、解糖系の代謝中間化合物であるホスホエノールピルビン酸に二酸化炭素（重炭酸イオン）を固定することに

よりオキザロ酢酸を生成し、トリカルボン酸（TCA）サイクルに4炭素（C₄）化合物を補充する生理的役割を果たすとされている。

【0003】 ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼは大部分の細菌、原生動物、すべての植物において存在が確認されている。該酵素をコードする遺伝子に関しては、高等植物に関し多数研究されているものの、細菌に関しては、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) 由来の遺伝子 [J. Biochem., 95, 909-916, (1984) 参照]、ブレビバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*) 由来の遺伝子 [特開平8-66189号公報]、コリネバクテリアム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) 由来の遺伝子 [Gene, 77, 237-251, (1989)]、放線菌 (*Streptomyces coelicolor*) 由来の遺伝子 [Biochem. J., 293, 131-136, (1993)]、好熱性細菌 (*Thermus* sp.) 由来の遺伝子 [J. Biochem., 118, 319-324, (1995)]、及び光合成細菌 (*Rhodopseudomonas palustris*) 由来の遺伝子 [J. Bacteriol., 179, 4942-4945, (1997) 参照] が単離されているのみである。

【0004】 TCAサイクルは、アミノ酸等各種有用物質生合成系において重要な代謝経路である。該遺伝子を利用することにより、TCAサイクルへの物質供給が強化され、オキザロ酢酸から生合成されるアミノ酸（アスパラギン酸、スレオニン等）の生産能の増強が期待されている。

【0005】 また、エシェリヒア・コリ由来のP E P Cに関しては、該酵素の反応機構等の基礎的研究が精力的に行われているものの、本発明者らが知る限り工業的観点からの利用については、オキザロ酢酸から生合成されるアミノ酸（アスパラギン酸、スレオニン等）の製造法 [特公平7-83714号公報、特開平9-121872号公報] を除き、殆ど検討されていない。

【0006】 すなわち、P E P C遺伝子を増強した好気性コリネ型細菌を用いて、オキザロ酢酸からTCAサイクルを逆行してリンゴ酸、フマル酸、コハク酸等を生成させる効率のよい製造方法は知られていない。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】 そのため、本発明の目的は、P E P C遺伝子で組み換えた好気性コリネ型細菌を用いてリンゴ酸、フマル酸、コハク酸等の有機酸の製造方法を提供することである。

【0008】

【課題を解決するための手段】 そこで、本発明者等は、好気性コリネ型細菌を用いてこれらの有機酸を生産する方法について検討したところ、好気性コリネ型細菌あるいはその調製物を、炭酸イオンもしくは重炭酸イオン又は二酸化炭素ガスを含有する反応液中で嫌気的に有機原料に作用させることにより、これらの有機酸を効率よく生産することが可能であることを見いだし、さらに好気性コリネ型細菌をP E P C遺伝子で組み換えることによ

り、PEPC活性を増強し、CO₂をホスホエノールピルビン酸に取り込ませる能力を増強した菌体を用いることにより、これら有機酸の生産性が著しく向上することを見いだし、本発明を完成した。

【0009】即ち、本発明の要旨は、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子で組み換えた好気性コリネ型細菌あるいはその調製物を、炭酸イオンもしくは重炭酸イオンまたは二酸化炭素ガスを含有する反応液中で嫌気的に有機原料に作用させ、有機酸を生成させることを特徴とする有機酸の製造方法に関する。

【0010】上記方法において、反応液に炭酸イオンもしくは重炭酸イオンまたは二酸化炭素ガスを含有させる方法としては、炭酸もしくは重炭酸またはそれらの塩を反応液に添加する方法、または反応液に二酸化炭素ガスを供給する方法が挙げられる。

【0011】上記ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子としては、微生物または植物由来の遺伝子が挙げられる。上記ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子としては、ロドシュードモナス パルストリス (*Rhodopseudomonas palustris*)、ブレビバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*)、ストレプトマイセス・コエリカラー (*Streptomyces coelicolor*)、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、アナベナ・バリアビリス (*Anabaena variabilis*)、アナシクティス・ニジュランス (*Anacystis nidulans*)、フラベリア・アウストララシカ (*Flaveria australasica*)、フラベリア・プリングレイ (*Flaveria pringlei*)、フラベリア・トリネビア (*Flaveria trinervia*)、アロエ・アルボレスセンス (*Aloe arborescens*)、ブラシカ・ナップス (*Brassica napus*)、ソラヌム・ツベロサム (*Solanum tuberosum*)、メセムブリアンセサム・クリスタリウム (*Mesembryanthemum crystallinum*)、ソルガム・ブルガレ (*Sorghum vulgare*)、ニコチアナ・タバコ (*Nicotiana tabacum*)、ダイズ又はトウモロコシ由来の遺伝子が挙げられる。

【0012】上記好気性コリネ型細菌としては、ブレビバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*) が挙げられる。また、ブレビバクテリウム・フラバムのとしては、ブレビバクテリウム・フラバム MJ-233が挙げられる。

【0013】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。本発明に使用されるPEPC遺伝子は、既にその塩基配列が決定されている遺伝子を、もしくは、通常の方法によりPEPC活性を有するタンパク質をコードするDNA断片を細菌、原生動物、植物等の染色体より単離し、塩基配列を決定したものを使用することができる。また、塩基配列が決定された後には、その配列にしたがって合成した遺伝子を使用することもできる。

【0014】

本発明のPEPC遺伝子を含むDNA断片

は、細菌、原生動物、植物由来の染色体上に存在している。これらの供給生物からPEPC遺伝子を調製するための基本操作を、好気性コリネ型細菌である、ブレビバクテリウム・フラバムMJ-233由来のものを一例として述べれば次のとおりである。

【0015】PEPC遺伝子は、上記ブレビバクテリウム・フラバムMJ-233株の染色体上に存在し、この染色体由来のDNAバンクから以下に述べるハイブリダイゼーション法によりPEPC遺伝子を分離・取得することができる。

【0016】先ず、ブレビバクテリウム・フラバムMJ-233株の培養物から染色体DNAを抽出する。この染色体DNAを適当な制限酵素、例えばSau3AIを用いて部分分解する。

【0017】得られる様々なDNA断片をプラスミドベクター、例えばpUC118(宝酒造製)に挿入し、ライプラリーを作製する。このプラスミドライプラリーを用いてエシェリヒア・コリ 例えば、JM109(宝酒造製)を形質転換することによりコロニーを形成させる。次いで、このコロニーのDNAをニトロセルロース膜に移し取り、公知の各種PEPC遺伝子において保存されている領域、例えばエシェリヒア・コリ由来のPEPC遺伝子 [J. Biochem., 95, 909-916, (1984)]、及びトウモロコシ由来のPEPC遺伝子 [Plant. Mol. Biol., 12, 579-589, (1989)] の共通領域配列である後記配列の配列番号1及び配列番号2に示す塩基配列を有する合成オリゴヌクレオチドをプローブとして用いた、コロニーハイブリダイゼーションを行う。

【0018】こうして、ベクターに挿入されたブレビバクテリウム・フラバムMJ-233株の染色体由来のDNA断片がPEPC遺伝子を含むことを確認することができる。ハイブリダイゼーション陽性のコロニーからプラスミドDNAを抽出し、挿入断片を制限酵素SalIで切り出すことで本発明のDNA断片を取得することができる。

【0019】このようにして得られるDNA断片の1つは、上記ブレビバクテリウム・フラバムMJ-233株染色体DNAを制限酵素SalIの完全分解により切断して得られる大きさが約3.3kbのDNA断片を挙げることができる。

【0020】本明細書における「切断断片の大きさ」及びプラスミドの大きさは、アガロースゲル電気泳動を用いる場合には、エシェリヒア・コリのラムダ・ファージ(λ phage)のDNAを制限酵素 HindIIIで切断して得られる分子量既知のDNA断片の同一アガロースゲル上での泳動距離で描かれる標準線に基づき、また、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いる場合には、エシェリヒア・コリのファイ・エックス174ファージ(ΦX174 phage)のDNAを制限酵素HaeIIIで切断して得られる分子量既知のDNA断片の

同一ポリアクリルアミドゲル上での泳動距離で描かれる標準線に基づき、切断DNA断片またはプラスミドの各DNA断片の大きさを算出することができる。尚、各DNA断片の大きさの決定において、1 kb以上の断片の大きさについては、1%アガロースゲル電気泳動によって得られる結果を採用し、約0.1 kbから1 kb未満の断片の大きさについては4%ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって得られる結果を採用した。

【0021】上記PEPC遺伝子を包含する本発明に用いるDNA断片は、天然のブレビバクテリウム・フラバムMJ-233染色体DNAから分離されたもののみならず、通常用いられるDNA合成装置、例えばアプライド・バイオシステムズ(Applied Biosystems)社製394 DNA/RNAシンセサイザーを用いて合成されたものであつてもよい。

【0022】また、前記の如くブレビバクテリウム・フラバムMJ-233の染色体DNAから取得されるPEPC遺伝子は、コードされるPEPCの機能、すなわち二酸化炭素固定に関する性質を実質的に損なうことがない限り、塩基配列の一部の塩基が他の塩基と置換されていてもよく、又は削除されていてもよく、或いは新たに塩基が挿入されていてもよく、さらに塩基配列の一部が転位されているものであってもよく、これらの誘導体のいずれもが、本発明に用いることができる。

【0023】また、ブレビバクテリウム・フラバムMJ-233以外のブレビバクテリウム・フラバムの菌株、または他の微生物もしくは植物由来のPEPC遺伝子を使用することもできる。特に、以下に示す微生物または植物由来のPEPC遺伝子は、その配列が既知(括弧内に文献を示す)であり、上記と同様にしてハイブリダイゼーションにより、あるいはPCR法によりそのORF部分を増幅することによって、取得することができる。得られた遺伝子は、後記実施例3(B)作製のベクターのtacプロモーター下流に挿入することができる。挿入したプラスミドを実施例3(D)の方法に従って好気性コリネ型細菌を形質転換し、有機酸の製造に使用することができる。

【0024】ロドシュードモナス パルストリス (J.Bacteriol., 179, 4942-4945, (1997))、ストレプトマイセス・コエリカラ (Biochem. J., 293, 131-136, (1993))、サッカロマイセス・セレビシエ (Nature, 387, May 29 suppl.)、アナベナ・バリアビリス (J. Gen. Microbiol., 138, 685-691, (1992))、アナシクティス・ニジュラヌス (Gene, 38, 265-269, (1985))、フラベリア・アウストララシカ、フラベリア・プリングレイ、フラベリア・トリネビア (以上、Mol. Gen. Genet., 234, 275-284, (1992))、アロエ・アルボレセンス (Plant Cell Physiol., 37, 881-888, (1996))、アブラナ (ブリシカ・ナブス) (Biosci. Biotechnol. Biochem., 58, 950-953, (1994))、ソラヌム・ツベロサム (Plant Mol. Biol., 23, 881

-888, 1993)、マツバギク (メセムブリアンセサム・クリスタリウム) (Nuc. Acid Res., 17, 6743-6746, (1989))、モロコシ (ソルガム・ブルガレ) (Gene, 99, 87-94, (1991))、タバコ (ニコチアナ・タバクム、Plant Mol. Biol., 17, 535-539, (1991))、ダイズ (Plant Mol. Biol., 20, 743-747, (1992))、トウモロコシ (Eur. J. Biochem., 181, 593-598, (1989))。

【0025】PEPC遺伝子を含むDNA断片は、適当な発現プラスミド、例えばpUC118(宝酒造製)へ挿入し、適当な宿主微生物、例えばエシェリヒア・コリJM109(宝酒造製)へ導入することにより発現させることができる。発現したPEPC遺伝子産物であるホスホエノールビルビン酸カルボキシラーゼの確認は、該形質転換体から粗酵素液を抽出し、Teraokaらの方法[H. Teraoka and K. Izui, Biochem., 13, 5121 (1974)]により直接PEPC活性を測定し、非形質転換株から抽出した粗酵素液のPEPC活性と比較することにより、あるいはPEPC遺伝子欠損変異株への上記発現プラスミドの導入による相補試験[Mol. Gen. Genet., 218, 330 (1989)]により確認することができる。

【0026】PEPC遺伝子を含むDNA断片は、適当なプラスミド、例えばコリネ型細菌内でプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子を少なくとも含むプラスミドベクターに導入することにより、コリネ型細菌内でPEPCの高発現可能な組換えプラスミドを得ることができる。

【0027】ここで、上記組み換えプラスミドにおいて、PEPC遺伝子を発現させるためのプロモーターはブレビバクテリウム属細菌が保有するプロモーターであることができるが、それに限られるものではなく、コリネ型細菌内でPEPC遺伝子の転写を開始させるための塩基配列であればいかなるプロモーターであっても良い。

【0028】PEPC遺伝子を導入することができるプラスミドベクターとしては、コリネ型細菌内の複製増殖機能を司る遺伝子を少なくとも含むものであれば特に制限はない。その具体例としては、例えば、特開平3-210184号公報に記載のプラスミドpCRY30；特開平2-72876号公報及び米国特許5,185,262号明細書に記載のプラスミドpCRY21、pCRY2KE、pCRY2KX、pCRY31、pCRY3KE及びpCRY3KX；特開平1-191686号公報に記載のプラスミドpCRY2およびpCRY3；特開昭58-67679号公報に記載のpAM330；特開昭58-77895号公報に記載のpHM1519；特開昭58-192900号公報に記載のpAJ655、pAJ611及びpAJ1844；特開昭57-134500号公報に記載のpCG1；特開昭58-35197号公報に記載のpCG2；特開昭57-183799号公報に記載のpCG4およびpCG11等を

挙げることができる。

【0029】それの中でもコリネ型細菌の宿主—ベクター系で用いられるプラスミドベクターとしては、コリネ型細菌内でプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子とコリネ型細菌内でプラスミドの安定化機能を司る遺伝子とを有するものが好ましく、例えば、プラスミドpCR Y30、pCRY21、pCRY2KE、pCRY2KX、pCRY31、pCRY3KEおよびpCRY3KX等が好適に使用される。

【0030】PEPC遺伝子を好気性コリネ型細菌内で複製可能なプラスミドベクターの適当な部位に挿入して得られる組み換えベクターで、コリネ型細菌、例えばブレビバクテリウム フラバム(*Brevibacterium flavum*)MJ-233-AB-41 (FERM BP-1498) を形質転換することにより、本発明で用いるPEPC遺伝子で組み換えられた好気性コリネ型細菌が得られる。

【0031】本発明に用いられるPEPC遺伝子で組み換えられた好気性コリネ型細菌又はその調製物とは、通常の好気的条件で増殖可能なコリネ型細菌またはその調製物であれば特に限定されるものではないが、例えば、ブレビバクテリウム属、コリネバクテリウム属、アースロバクター属等のコリネ型細菌またはその調製物が挙げられる。これらのうち、特にブレビバクテリウム フラバム (*Brevibacteriumflavum*) MJ-233 (FERM BP-1497), 同MJ-233-AB-41 (FERM BP-1498)、ブレビバクテリウム アンモニアゲネス (*Brevibacterium ammoniagenes*) ATCC6872、コリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC31831、ブレビバクテリウム ラクトファーメンタム (*Brevibacterium lactofermentum*) ATCC13869等のコリネ型細菌またはその調製物が好適に用いられる。

【0032】好気性コリネ型細菌を本発明の方法に用いるためには、まず菌体を通常の好気的な条件で培養した後用いることができる。培養に用いる培地は、通常微生物の培養に用いられる培地を用いることができる。例えば、硫酸アンモニウム、リン酸カリウム、硫酸マグネシウム等の無機塩からなる組成に、肉エキス、酵母エキス、ペプトン等の天然栄養源を添加した一般的な培地を用いる事ができる。

【0033】培養後の菌体は、遠心分離、膜分離等によって回収し、菌体をそのまま又は調製物として次に示す反応に用いられる。ここでいう調製物とは、例えば、菌体をアクリルアミド、カラギーナン等で固定化した固定化菌体、菌体を破碎した破碎物、その遠心分離上清、またその上清を疏安処理等で部分精製したPEPC活性を有する画分等を指す。

【0034】反応液には、水、緩衝液、培地等が用いられるが、適当な無機塩を含有した培地が最も好ましい。反応液には、例えばグルコース、エタノール等の有機原

料と炭酸イオン、重炭酸イオンまたは二酸化炭素ガスを含有させ、嫌気的条件で反応させることが特徴である。この場合の、有機原料としては、特に限定されることなく、目的とする有機酸に応じて選択可能であり、一般的な有機原料から選択できる。具体的には、安価であり、目的の有機酸の生成速度の速いグルコースやエタノールが好適に用いられる。この場合、グルコースの添加濃度は、0.5g/1~500g/1が好ましく、エタノールの添加濃度は、0.5g/1~30g/1が好ましい。

【0035】炭酸イオン、重炭酸イオンは、1mM~500mM、好ましくは2~300mM、さらに好ましくは3~200mMの濃度で添加する。二酸化炭素ガスを含有させる場合は、溶液1L当たり50mg~25g、好ましくは100mg~15g、さらに好ましくは150mg~10gの二酸化炭素ガスを含有させる。

【0036】また、嫌気的条件とは、溶液中の溶存酸素濃度を低く抑えて反応させることを指す。この場合、溶存酸素濃度として0~2ppm、好ましくは0~1ppm、さらに好ましくは0~0.5ppmで反応させることが望ましい。そのための方法としては、例えば容器を密閉して無通気で反応させる、窒素ガス等の不活性ガスを供給して反応させる、二酸化炭素ガス含有の不活性ガスを通気する等の方法を用いることができる。

【0037】反応の温度は、通常15℃~45℃、好ましくは25℃~37℃で行う。pHは、5~9、好ましくは6~8の範囲で行う。反応は、通常5時間から120時間行う。反応に用いる菌体の量は、とくに規定されないが、1g/1~700g/1、好ましくは10g/1~500g/1さらに好ましくは20g/1~400g/1が用いられる。菌体の調製物を用いる場合は、上記の量の菌体量に相当する量を用いることが好ましい。

【0038】以上の様な方法で製造した有機酸は、必要に応じて、反応液から通常の分離、精製方法で分離、精製することができる。具体的には、限外ろ過膜分離、遠心分離等により菌体及びその調製物と分離した後、カラム法、晶析法等の公知の方法で精製し、乾燥させる事により、結晶として採取する方法等が挙げられる。

【0039】本発明で、製造の対象となる有機酸としては、特に限定されるものではないが、本発明の効果からは、酸素含有雰囲気で、好気性コリネ細菌又はその調製物で効率的に製造できない化合物が特に好ましい。

【0040】具体的には、有機カルボン酸が挙げられ、より具体的にはコハク酸、リンゴ酸、フマル酸等が挙げられる。

【0041】以上に本発明を説明してきたが、下記の実施例により更に具体的に説明する。しかしながら、実施例は本発明の具体的な認識を得る一助とみなすべきものであり、本発明の範囲を限定するものではないことを理解すべきである。

【0042】

【実施例】〔実施例1〕プレビバクテリウム・フラバムMJ-233株由来のPEPC遺伝子を含むDNA断片のクローニング

(A) プレビバクテリウム・フラバム MJ-233株の全DNAの抽出：A培地1L [組成：尿素：4g、(NH₄)₂SO₄：1.4g、KH₂PO₄：0.5g、K₂HPO₄：0.5g、MgSO₄·7H₂O：0.5g、FeS O₄·7H₂O：20mg、MnSO₄·nH₂O：20mg、D-ビオチン：200μg、塩酸チアミン：100μg、酵母エキス1g、カザミノ酸1g及び蒸留水：1000ml(pH6.6)]にプレビバクテリウム・フラバム MJ-233株を白金耳を用いて植菌し、を対数増殖期後期まで30℃で培養し、菌体を集めた。

【0043】プレビバクテリウム・フラバム MJ-233は、1975年4月28日に、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号、郵便番号305)に受託番号FERM P-3068として寄託され、1981年5月1日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、受託番号FERM B P-1497が付与されている。

【0044】得られた菌体を10mg/mlの濃度になるよう、10mg/mlリゾチーム、10mM NaCl、20mMトリス緩衝液(pH8.0)及び1mM EDTA·2Naの各成分を含有する溶液15ml(各成分の濃度は最終濃度である)に懸濁した。次にプロテナーゼKを最終濃度が100μg/mlになるように添加し、37℃で1時間保温した。さらにドデシル硫酸ナトリウム(SDS)を最終濃度が0.5%になるように添加し、50℃で6時間保温して溶菌した。この溶菌液に、等量のフェノール/クロロホルム溶液を添加し、室温で10分間ゆるやかに振盪した後、全量を遠心分離(5,000×g, 20分間, 10~12℃)し、上清画分を分取した。この上清に酢酸ナトリウムを0.3Mとなるよう添加した後、2倍量のエタノールをゆっくりと加えた。水層とエタノール層の間に存在するDNAをガラス棒でまきとり、70%エタノールで洗浄した後、風乾した。得られたDNAに10mMトリス緩衝液(pH7.5)-1mMEDTA·2Na溶液5mlを加え、4℃で一晩静置し、以後の実験に用いた。

【0045】(B) プレビバクテリウム・フラバム MJ-233株由来のPEPC遺伝子を含むDNA断片のクローニング及び組換え体の創製

上記(A)項で得たプレビバクテリウム・フラバム MJ-233の全DNA溶液の90μlを制限酵素S a 1 I 50U(units)を用い、37℃で1時間反応させ完全分解した。このS a 1 I分解DNAに、クローニングベクターpUC118(宝酒造製)を制限酵素S a 1 Iで切断した後脱リン酸化処理したものを混合し、50mMトリス緩衝液(pH7.6)、10mMジチオスレイト

ール、1mM ATP、10mM MgCl₂、及びT4 DNAリガーゼ1Uの各成分を添加し(各成分の濃度は最終濃度である)、4℃で15時間反応させ、両者を結合させた。

【0046】得られたプラスミド混液を用い、塩化カルシウム法[ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(J. Molecul. Biol.)、53、159(1970)]によりエシェリヒア・コリJM109(宝酒造製)を形質転換し、アンピシリン50mgを含む培地(トリプトン10g、酵母エキス5g、NaCl 5g及び寒天16gを蒸留水1Lに溶解)に塗抹した。

【0047】この培地上の生育株を常法[モレキュラー・クローニング(Molecular cloning)、Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)]により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを、制限酵素S a 1 Iにより切断し、0.7%アガロースゲルを用いて電気泳動を行った。このアガロースゲルよりDNAをナイロン膜上に移し取り、エシェリヒア・コリ及びトウモロコシ由来PEPC遺伝子の共通領域をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行つた。用いたプローブは、

【0048】エシェリヒア・コリ、トウモロコシ由来のPEPC遺伝子から推定されるアミノ酸配列のうち特に相同性の高い領域に注目し、そのアミノ酸配列(配列番号3及び配列番号4)より推定される混合オリゴヌクレオチドプローブ(配列番号1及び配列番号2)を用いた。このオリゴヌクレオチドは、アプライド・バイオシステムズ(Applied Biosystems)社製394型DNA/RNAシンセサイザーを用いて合成した。なお、プローブの合成にあたっては、混合の度合いが著しくなりすぎぬようデオキシイノシンを用いた。

【0049】合成した上記オリゴヌクレオチドプローブをT4ポリヌクレオチドキナーゼ(宝酒造製)を用いる手法[アナリティカル・バイオケミストリー(Anal. Biocem.)、158、307~315(1986)]で、5'末端リン酸基を[γ-³²P]ATPでラジオアイソトープラベルした。サザンハイブリダイゼーションは、常法[モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning)、Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)]に従つて行った。

【0050】この結果、制限酵素S a 1 I分解物の大きさが約3.3kbのDNA断片のみ上記プローブとハイブリダイズすることが判明し、該DNA断片中にPEPC遺伝子が含まれることが明らかとなった。この大きさが約3.3kbのDNA断片を保有する本プラスミドをpUC118-ppcと命名した。

【0051】以上によりPEPC遺伝子DNAを含む大きさが約3.3kbのDNA断片(S a 1 I断片)を得ることができた。

【0052】(C) PEPC遺伝子の塩基配列の決定

上記(C)で得られた挿入DNA断片を制限酵素Sau 3A Iを用いて37℃で処理して部分分解した。また、pUC118ベクター(宝酒造製)を制限酵素BamH Iで完全に分解した。得られたベクターDNA断片と部分分解DNA断片とを混合し、この混合液に、それぞれ最終濃度が、50mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.9), 10mM MgCl₂, 20mMジチオスレイトール, 1mM ATP, T4 DNAリガーゼ 1unit/50μlとなるように各成分を添加し、ベクターDNA断片と部分分解DNA断片とを結合させた。

【0053】同様に(C)で得られた挿入DNA断片を制限酵素Tac Iを用いて37℃で処理して部分分解した。また、pUC118ベクター(宝酒造製)を制限酵素Acc Iで完全に分解した。得られたベクターDNA断片と部分分解DNA断片とを混合し、この混合液に、それぞれ最終濃度が、50mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.9), 10mM MgCl₂, 20mMジチオスレイトール, 1mM ATP, T4 DNAリガーゼ 1unit/50μlとなるように各成分を添加し、ベクターDNA断片と部分分解DNA断片とを結合させた。

【0054】ついで、常法[J. Mol. Biol., 53, 159(1970)参照]に従って、得られた溶液を各々用いて大腸菌JM109(宝酒造製)を形質転換した。得られた形質転換菌を選択培地[組成:トリプトン10g, 酵母エキス5g, NaCl 5g, 寒天15g, アンビシリン50mgを蒸留水に溶解して1Lとする]に塗抹し、37℃で16時間培養した。

【0055】選択培地上に生育した菌株を、アンビシリンを最終濃度で50μg/ml含有するL培養液[トリプトン10g, 酵母エキス5g, NaCl 5gを蒸留水に溶解して1Lとする]に植菌し、これを37℃で7時間培養した。培養液を4℃で10分間8,000×gの遠心分離にかけて菌体を回収した。回収した菌体からアルカリ-SDS法[T. Maniatis, E. F. Fritsch, J. Sambrook, Molecular cloning, p. 90-91(1982)参照]によりプラスミドを抽出した。

【0056】抽出したプラスミドDNAを用いて、ベクターpUC118に挿入されたDNA断片の塩基配列を決定した。pUC118に挿入されたDNA断片の塩基配列の決定には、バーキン・エルマー社製のダイブライマーサイクルシーケンスキットを用いて行った。そして、これらの決定された個々の配列の連結を、バーキン・エルマー社製のシークエンス解析ソフトオートアッセンブラー(Auto assembler)を用いて行った。その結果、上記(B)で得られた3.3kbの挿入Sal I DNA断片には、既知のエシェリヒア・コリ由来のPEPCタンパク質と高い相同意を持ったタンパク質をコードする遺伝子(配列番号5記載に記載するオープン・リーディング・フレーム)を含有していることが

判明した。

【0057】〔実施例2〕PEPC遺伝子DNAの発現の確認

実施例1の(B)項で得られたPEPC遺伝子を含む約3.3kbのDNA断片が挿入されたプラスミドpUC118-ppcを用い、塩化カルシウム法によりPEPC遺伝子欠損変異株であるエシェリヒア・コリCGSC #3594株[Genetics, 51, 167(1965)]を形質転換し、アンビシリン50μg/mlを含む最少培地[組成: KH₂PO₄ 2g, K₂HPO₄ 7g, (NH₄)₂SO₄ 1g, MgSO₄·7H₂O 0.1g, L-スレオニン50mg, L-ロイシン50mg, L-ヒスチジン50mg, L-アルギニン50mg, チアミン塩酸塩10mg, グルコース2g, 寒天15g, 蒸留水1L]に塗末し、相補試験を行った。同時に对照として挿入遺伝子を含まないプラスミドpUC118を用いて、同様に上記欠損変異株を形質転換した。

【0058】その結果、上記約3.3kbのDNA断片を含むプラスミドが導入された形質転換体のみが培地上に生育することが観察され、PEPC遺伝子が発現していることが確認された。

【0059】〔実施例3〕PEPC遺伝子によるコリネ型細菌組み換え体の作製

(A) シャトルベクターの構築

特開平3-210184号公報に記載のプラスミドpCRY30内に存在する、コリネ型細菌内のプラスミドの安定化に必要な領域の配列をもとに、下記の1対のプライマーを、アプライド・バイオシステムズ(Applied Biosystems)社製「394 DNA/RNAシンセサイザ(synthesizer)」を用いて合成した。

【0060】(a-1) 5'-TTT CTC GAG CGC ATT ACC T CC TTG CTA CTG-3' (配列番号6)

(b-1) 5'-TTT GAA TTC GAT ATC AAG CTT GCA CAT C AA-3' (配列番号7)

【0061】上記プラスミドpCRY30は、次のようにして構築されたプラスミドである。ブレビバクテリウム・スタチオニス(Brevibacterium stacionis)IFO12144(工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM BP-2515の受託番号で寄託されている)からプラスミドpBY503

(このプラスミドの詳細については特開平1-95785号公報参照)DNAを抽出し、制限酵素Xba Iで大きさが約4.0kbのプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子を含むDNA断片(複製領域)を切り出し、制限酵素Eco RIおよびKpn Iで大きさが約2.1kbのプラスミドの安定化機能を司る遺伝子を含むDNA断片(安定化領域)を切り出す。これらの両DNA断片をプラスミドpHSG298(宝酒造製)のEco RI-Kpn I部位及びSal I部位にそれぞれ組み込むことにより、プラスミドベクターpCRY30を調製することができる。

【0062】実際のPCRは、バーキンエルマーシータス社製の「DNAサーマルサイクラー」を用い、反応試薬として、レコンビナント・タックDNA・ポリメラーゼ・タカラ・タック (Recombinant TaqDNA Polymerase *)

反応液：

(10×) PCR緩衝液	10 μl
1. 25 mM dNTP混合液	1.6 μl
錫型DNA	1.0 μl (DNA含有量 1 μM以下)
上記記載のa-1, b-1プライマー	各々 1 μl (最終濃度 0.25 μM)
)	
レコンビナント・タックDNA・ポリメラーゼ	0.5 μl
滅菌蒸留水	61.5 μl

以上を混合し、この100 μlの反応液をPCRにかけた。

【0064】PCRサイクル：

デナチュレーション過程：94°C 60秒

アニーリング過程：52°C 60秒

エクステンション過程：72°C 120秒

【0065】以上を1サイクルとし、25サイクル行った。上記で生成した反応液10 μlを0.8%アガロースゲルにより電気泳動を行い、約1.1kbのDNA断片が検出できた。

【0066】上記で増幅産物を確認できた反応液10 μl、プラスミドpBlue script II ISK+ 1 μlを、各々制限酵素EcoRIおよびXhoIで完全に切断し、70°Cで10分間処理させることにより制限酵素を失活させた後、両者を混合し、これに、T4 DNAリガーゼ10×緩衝液1 μl、T4 DNAリガーゼ1 unitの各成分を添加し、滅菌蒸留水で10 μlにして、15°Cで3時間反応させ、結合させた。

【0067】得られたプラスミド混液を用い、塩化カルシウム法 [Journal of Molecular Biology, 53, 159(1970)]によりエシェリヒア・コリJM109(宝酒造製)を形質転換し、アンピシリン50mgを含む培地[トリプトン10g、イーストエキストラクト5g、NaCl 5g及び寒天16gを蒸留水1Lに溶解]に塗抹した。

【0068】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素(EcoRI, XhoI)により切断し、挿入断片を確認した。この結果、プラスミドpBlue script II ISK+の長さ3.0kbのDNA断片に加え、長さ1.1kbの挿入DNA断片が認められた。本プラスミドをpBSparと命名した。

【0069】米国特許5,185,262号明細書記載のプラスミドpCRY31内に存在する、コリネ型細菌内のプラスミドの複製に必要な領域の配列をもとに、下記の1対のプライマーを、アプライド・バイオシステムズ(Applied Biosystems)社製「394 DNA/R※

反応液：

* TaKaRa Taq (宝酒造製) を用いて下記の条件で行った。

【0063】

(10×) PCR緩衝液	10 μl
1. 25 mM dNTP混合液	1.6 μl
錫型DNA	1.0 μl (DNA含有量 1 μM以下)
上記記載のa-1, b-1プライマー	各々 1 μl (最終濃度 0.25 μM)

レコンビナント・タックDNA・ポリメラーゼ 0.5 μl

滅菌蒸留水 61.5 μl

※NAシンセサイザー(synthesizer)」を用いて合成した。

【0070】(a-2) 5'-TTT GGT ACC GAC TTA GAT A AA GGT CTA-3' (配列番号8)

(b-2) 5'-TTT CTC GAG TGC TGG TAA AAC AAC TTT-3' (配列番号9)

【0071】上記プラスミドpCRY31は、次のようにして構築されたプラスミドである。前記pBY503由来の複製領域とプラスミドpHSG398(宝酒造製)とを連結したプラスミドpCRY3(このプラスミドを保持するプレビバクテリウム・フラバムMJ233GE102は、FERM BP-2513として工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている)をKpnIで部分分解してDNA断片を得る。一方、pBY503をプレビバクテリウム・ラクトファーメンタムIFO12144(FERM BP-2515)から調製し、KpnIで完全分解し、約7kbのDNA断片を精製する。これらDNA断片を連結し、各種制限酵素で切断したときに下記表に示す切断パターンを示すプラスミドを選択することによって、pCRY31が得られる。

【0072】

【表1】

	制限酵素	認識部位数	断片の長さ(kb)
	KpnI	3	7.0, 6.0, 2.2
	SauI	2	10.0, 5.2
40	PstI	2	13.0, 2.2
	BamHI	1	15.2

【0073】実際のPCRは、バーキンエルマーシータス社製の「DNAサーマルサイクラー」を用い、反応試薬として、レコンビナント・タックDNA・ポリメラーゼ・タカラ・タック(Recombinant TaqDNA Polymerase TaKaRa Taq)(宝酒造製)を用いて下記の条件で行った。

【0074】

15

(10×) PCR緩衝液	10 μl
1. 25 mM dNTP混合液	16 μl
錆型DNA	10 μl (DNA含有量 1 μM以下)
上記記載のa-2, b-2プライマー	各々1 μl (最終濃度0.25 μM)

)

レコンビナント・タックDNA・ポリメラーゼ	0.5 μl
滅菌蒸留水	61.5 μl

以上を混合し、この100 μlの反応液をPCRにかけた。

【0075】PCRサイクル：

デナチュレーション過程：94°C 60秒

アニーリング過程：52°C 60秒

エクステンション過程：72°C 120秒

【0076】以上を1サイクルとし、25サイクル行った。上記で生成した反応液10 μlを0.8%アガロースゲルにより電気泳動を行い、約1.8 kbのDNA断片が検出できた。

【0077】上記で増幅産物を確認できた反応液10 μl、プラスミドpBSpa r 1 μlを各々制限酵素Xho IおよびKpn Iで完全に切断し、70°C 10分処理させることにより制限酵素を失活させた後、両者を混合し、T4 DNAリガーゼ10×) 緩衝液 1 μl、T4 DNAリガーゼ1unitの各成分を添加し、滅菌蒸留水で10 μlにして、15°Cで3時間反応させ、結合させた。

【0078】得られたプラスミド混液を用い、塩化カルシウム法 [Journal of Molecular Biology, 53, 159 (1970)]によりエシェリヒア・コリJM109 (宝酒造製) を形質転換し、アンピシリン 50 mgを含む培地 [トリプトン 10 g、イーストエキストラクト 5 g、NaCl 5 g及び寒天 16 gを蒸留水1 Lに溶解] に塗抹した。

【0079】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素(Xho I, Kpn I)により切断し、挿入断片を確認した。この結果、プラスミドpBSpa r の長さ4.1 kbのDNA断片に加え、長さ1.8 kbの挿入DNA断片が認められた。本プラスミドをpBSpa rと命名した。

(a-3) 5'-TTT GGT ACC GAT AGC TTA CTC CCC ATC CCC-3' (配列番号10)

(b-3) 5'-TTT GGA TCC CAA CAT ATG AAC ACC TCC TTT TTA TCC GCT CAC

AAT TCC ACA CAT-3' (配列番号11)

【0085】実際のPCRは、パーキンエルマーシータス社製の「DNAサーマルサイクラー」を用い、反応試薬として、レコンビナント・タックDNA・ポリメラーゼ・タカラ・タック (Recombinant TaqDNA Polymerase ※

反応液：

(10×) PCR緩衝液	10 μl
1. 25 mM dNTP混合液	16 μl
錆型DNA	10 μl (DNA含有量 1 μM以下)
上記記載のa-3, b-3プライマー	各々1 μl (最終濃度0.25 μM)

16

*par-repと命名した。

【0080】上記で作製したプラスミドpBSpa r-10 rep 1 μl、pHSG298 (宝酒造社製) 1 μlを各々制限酵素Kpn IおよびEcoRIで完全に切断し、70°Cで10分処理させることにより制限酵素を失活させた後、両者を混合し、これに、T4 DNAリガーゼ10×) 緩衝液 1 μl、T4 DNAリガーゼ1unitの各成分を添加し、滅菌蒸留水で10 μlにして、15°Cで3時間反応させ、結合させた。

【0081】得られたプラスミド混液を用い、塩化カルシウム法 [Journal of Molecular Biology, 53, 159 (1970)]によりエシェリヒア・コリJM109 (宝酒造製) を形質転換し、カナマイシン 50 mgを含む培地 [トリプトン 10 g、イーストエキストラクト 5 g、NaCl 5 g及び寒天 16 gを蒸留水1 Lに溶解] に塗抹した。

【0082】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、挿入断片を確認した。この結果、プラスミドpHSG298の長さ2.6 kbのDNA断片に加え、長さ2.9 kbの挿入DNA断片が認められた。本プラスミドをpHSG298par-repと命名した。

【0083】(B) tacプロモーターの挿入
tacプロモーターを含有するプラスミドpTrc99A (ファルマシア社製) を錆型としたPCR法により、tacプロモーター断片を増幅させるべく、下記の1対のプライマーを、アプライド・バイオシステムズ (Applied Biosystems) 社製「394 DNA/RNAシンセサイザー (synthesizer)」を用いて合成した。

【0084】

(a-3) 5'-TTT GGT ACC GAT AGC TTA CTC CCC ATC CCC-3' (配列番号10)

(b-3) 5'-TTT GGA TCC CAA CAT ATG AAC ACC TCC TTT TTA TCC GCT CAC

AAT TCC ACA CAT-3' (配列番号11)

※TaKaRa Taq (宝酒造製) を用いて下記の条件で行った。

【0086】

)

レコンビナント・タックDNA・ポリメラーゼ 0. 5 μ l
滅菌蒸留水

以上を混合し、この100 μ lの反応液をPCRにかけた。

【0087】PCRサイクル：

デナチュレーション過程：94°C 60秒
アニーリング過程：52°C 60秒
エクステンション過程：72°C 120秒

【0088】以上を1サイクルとし、25サイクル行った。上記で生成した反応液10 μ lを3%アガロースゲルにより電気泳動を行い、約100 bpのDNA断片が検出できた。

【0089】上記で増幅産物を確認できた反応液10 μ l、上記(A)で作製したプラスミドpHSG298parr-rep 5 μ lを各々制限酵素BamHIおよびKpnIで完全に切断し、70°Cで10分処理することにより制限酵素を失活させた後、両者を混合し、これに、T4 DNAリガーゼ10×緩衝液1 μ l、T4DNAリガーゼ1 unitの各成分を添加し、滅菌蒸留水で10 μ lにして、15°Cで3時間反応させ、結合させた。

【0090】得られたプラスミド混液を用い、塩化カルシウム法〔Journal of Molecular Biology, 53, 159 (1970)〕によりエシェリヒア・コリJM109(宝酒造製)を形質転換し、カナマイシン50mgを含む培地〔トリプトン10g、イーストエキストラクト5g、NaCl 5g及び寒天16gを蒸留水1Lに溶解〕に塗抹した。

*

反応液：

(10×) PCR緩衝液
1. 25 mM dNTP混合液
錠型DNA
上記記載のa-4, b-4プライマー

)

レコンビナント・タックDNA・ポリメラーゼ 0. 5 μ l
滅菌蒸留水

以上を混合し、この100 μ lの反応液をPCRにかけた。

【0096】PCRサイクル：

デナチュレーション過程：94°C 60秒
アニーリング過程：52°C 60秒
エクステンション過程：72°C 120秒

【0097】以上を1サイクルとし、25サイクル行った。上記で生成した反応液10 μ lを0.8%アガロースゲルにより電気泳動を行い、約2.8 kbのDNA断片が検出できた。

【0098】上記で増幅産物を確認できた反応液10 μ l、上記(B)で作製したプラスミドpHSG298 tac 5 μ lを各々制限酵素BglII, SseIまたは

61. 5 μ l

* 【0091】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、挿入断片を確認した。この結果、上記(A)作製のプラスミドの長さ5.5 kbのDNA断片に加え、長さ0.1 kbの挿入DNA断片が認められた。このプラスミドをpHSG298tacと命名した。

【0092】(C) PEPC遺伝子のシャトルベクターへの挿入

PEPC遺伝子を含有するプラスミド(上記実施例1(B))を錠型としたPCR法により、PEPC遺伝子ORF部分を増幅させるべく、下記の1対のプライマーを、アプライド・バイオシステムズ(Applied Biosystems)社製「394 DNA/RNAシンセサイザ(synthesizer)」を用いて合成した。

【0093】(a-4) 5'-TTT CAT ATG ACT GAT TTT T
20 TA CGC GAT -3' (配列番号12)

(b-4) 5'-TTT CCT GCA GGC TAG CCG GAG TTG CGC A
GT GCA -3' (配列番号13)

【0094】実際のPCRは、パーキンエルマーシータス社製の「DNAサーマルサイクラー」を用い、反応試薬として、レコンビナント・タックDNA・ポリメラーゼ・タカラ・タック(Recombinant TaqDNA Polymerase TaKaRa Taq)(宝酒造製)を用いて下記の条件で行った。

【0095】

10 μ l
16 μ l
10 μ l (DNA含有量 1 μ M以下)
各々 1 μ l (最終濃度 0.25 μ M)

レコンビナント・タックDNA・ポリメラーゼ 0. 5 μ l

61. 5 μ l

BamHI, SseIで各々切断し、70°Cで10分処理することにより制限酵素を失活させた後、両者を混合し、これに、T4 DNAリガーゼ10×緩衝液1 μ l、T4 DNAリガーゼ1 unitの各成分を添加し、滅菌蒸留水で10 μ lにして、15°Cで3時間反応させ、結合させた。

【0099】得られたプラスミド混液を用い、塩化カルシウム法〔Journal of Molecular Biology, 53, 159 (1970)〕によりエシェリヒア・コリJM109(宝酒造製)を形質転換し、カナマイシン50mgを含む培地〔トリプトン10g、イーストエキストラクト5g、NaCl 5g及び寒天16gを蒸留水1Lに溶解〕に塗抹した。

【0100】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素(Sse I, Nde I)により切断し、挿入断片を確認した。この結果、上記(B)作製のプラスミドの長さ5.6kbのDNA断片に加え、長さ2.8kbの挿入DNA断片が認められた。このプラスミドをpPEPC1と命名した。

【0101】(D) ブレビバクテリウム・フラバム MJ-233-AB-41株の形質転換

本プラスミドを米国特許第5,185,262号明細書記載の方法に従って、ブレビバクテリウム・フラバム MJ-233-AB-41(FERM BP-1498)に導入した。

【0102】ブレビバクテリウム・フラバムMJ-233-AB-41は、1976年11月17日に、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号、郵便番号305)に受託番号FERM P-3812として寄託され、1981年5月1日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、受託番号FERM BP-1498が付与されている。

【0103】〔実施例4〕有機酸の製造(I)

尿素: 4 g, (NH₄)₂SO₄: 14 g, KH₂PO₄: 0.5 g, K₂HPO₄: 0.5 g, MgSO₄·7H₂O: 0.5 g, FeSO₄·7H₂O: 20 mg, MnSO₄·nH₂O: 20 mg, D-ビオチン: 200 μg, 塩酸チアミン: 100 μg, 酵母エキス1g, カザミノ酸1g及び蒸留水: 1000ml(pH 6.6)の培地を100mlずつ500ml容の三角フラスコに分注し、120℃、15分間滅菌処理したものに、滅菌済み50%グルコース水溶液4mlを加え、上記pPEPC1プラスミドを導入し形質転換させたブレビバクテリウム・フラバム MJ-233-AB-41菌株を植菌し、33℃にて24時間振とう培養した(好気的培養)。培養終了後、遠心分離(8000g、20分)により菌体を回収した。得られた菌体全量を以下の反応に供試した。

【0104】(NH₄)₂SO₄: 23 g, KH₂PO₄: 0.5 g, K₂HPO₄: 0.5 g, MgSO₄·7H₂O: 0.5 g, FeSO₄·7H₂O: 20 mg, MnSO₄·nH₂O: 20 mg, D-ビオチン: 200 μg, 塩酸チアミン: 100 μg, 炭酸ナトリウム20g/L、蒸留水: 1000mlの培地を2L容のジャーファーメンターに入れ、上記菌体とグルコース50%液120mlを添加し、密閉した状態で(溶存酸素濃度0.1ppm)、これを30℃にて24時間ゆるく(200rpm)攪拌し、反応させた。得られた培養液を遠心分離(8000rpm、15分、4℃)して得られた上清液を分析したところ、乳酸が29.5g/L、酢酸が4.5g/L、コハク酸が15g/L、リンゴ酸が0.9g/L生成していた。

【0105】〔実施例5〕有機酸の製造(II)

実施例4と同様に培養した菌体を、以下の反応に供試した。

【0106】(NH₄)₂SO₄: 23 g, KH₂PO₄: 0.5 g, K₂HPO₄: 0.5 g, MgSO₄·7H₂O: 0.5 g, FeSO₄·7H₂O: 20 mg, MnSO₄·nH₂O: 20 mg, D-ビオチン: 200 μg, 塩酸チアミン: 100 μg、蒸留水: 1000mlの培地を2L容のジャーファーメンターに入れ、上記菌

10 体とグルコース50%液120mlを添加し、ここに10%二酸化炭素ガス(90%窒素ガス)を0.1vvmの速度で供給しながら30℃にて24時間ゆるく(200rpm)攪拌し、反応させた。得られた培養液を遠心分離(8000 rpm、15分、4℃)して得られた上清液を分析したところ、乳酸が28g/L、酢酸が3.5g/L、コハク酸が16g/L、リンゴ酸が1.0g/L生成していた。

【0107】〔比較例1〕形質転換しないブレビバクテリウム・フラバム MJ-233-AB-41株を用いた以外は、実施例4と同様に行った。

【0108】尿素: 4 g, (NH₄)₂SO₄: 14 g, KH₂PO₄: 0.5 g, K₂HPO₄: 0.5 g, MgSO₄·7H₂O: 0.5 g, FeSO₄·7H₂O: 20 mg, MnSO₄·nH₂O: 20 mg, D-ビオチン: 200 μg, 塩酸チアミン: 100 μg、酵母エキス1g、カザミノ酸1g及び蒸留水: 1000ml(pH 6.6)の培地を100mlずつ500ml容の三角フラスコに分注し、120℃、15分間滅菌処理したものに滅菌済み50%グルコース水溶液4mlを加え、ブレビバクテリウム・フラバム MJ-233-AB-41菌株を植菌し、33℃にて24時間振とう培養した(好気的培養)。培養終了後、遠心分離(8000g、20分)により菌体を回収した。得られた菌体全量を以下の反応に供試した。

【0109】(NH₄)₂SO₄: 23 g, KH₂PO₄: 0.5 g, K₂HPO₄: 0.5 g, MgSO₄·7H₂O: 0.5 g, FeSO₄·7H₂O: 20 mg, MnSO₄·nH₂O: 20 mg, D-ビオチン: 200 μg, 塩酸チアミン: 100 μg、炭酸ナトリウム20g/L、蒸留水: 1000mlの培地を2L容のジャーファーメンターに入れ、上記菌体とグルコース50%液120mlを添加し、密閉した状態で(溶存酸素濃度0.1ppm)、これを30℃にて24時間ゆるく(200rpm)攪拌し、反応させた。得られた培養液を遠心分離(8000rpm、15分、4℃)して得られた上清液を分析したところ、乳酸が33.5g/L、酢酸が5g/L、コハク酸が10g/L、リンゴ酸が0.5g/L生成していた。

【0110】〔比較例2〕炭酸イオンを添加しない以外50 は、実施例4と同様に行った。(NH₄)₂SO₄: 23

g, KH₂PO₄: 0. 5 g, K₂HPO₄: 0. 5 g, MgSO₄·7H₂O: 0. 5 g, FeSO₄·7H₂O: 20 mg, MnSO₄·nH₂O: 20 mg, D-ビオチン: 200 μg, 塩酸チアミン: 100 μg、蒸留水: 1000 ml の培地を 2 L 容のジャーファーメンターに入れ、実施例 4 と同様に培養した菌体とグルコース 5.0 % 液 120 ml を添加し、密閉した状態で（溶存酸素濃度 0. 1 ppm）、30℃で 24 時間ゆるく (200 rpm) 換押し、反応させた。得られた培養液を遠心分離 (800 rpm、15 分、4℃) して得られた上清液を分析したところ、乳酸が 1.4 g/L、酢酸が 3.5 g/L、コハク酸が 2.4 g/L、リンゴ酸が 0.5 g/L 生成していた。

【0111】〔実施例 6〕ロドシードモナス・パルストリス由来の PEP C 遺伝子を用いた有機酸の製造
ロドシードモナス・パルストリス由来の PEP C 遺伝子はその配列が既知 (GenBank Acession No. D89668, J. Bacteriol., 179, 4942-4945 (1997)) であるため、実施例 1 (A) に示したように菌体を培養し、染色体 DNA を調製し、これを PCR の錠型として用いて、実施例 3 (D) で使用したプライマー (a-4, b-4) の代わりに、次の 2 つのプライマー (a-5, b-5) により、PEP C をコードする遺伝子部分を増幅させることができる。以下、実施例 3 (D) と同様の手法で、ロドシードモナス・パルストリス由来の PEP C 遺伝子で組み換えた好気性コリネ型細菌を得ることができる。

【0112】(a-5) 5'-TTT CAT ATG TCG TCG TTG AAC CTG -3' (配列番号 14)
(b-5) 5'-TTT CCT GCA GGT CAC CCG CTA TTC CGC AGC -3' (配列番号 15)

【0113】得られたコリネ型細菌を実施例 4 の方法に従って培養したところ、コハク酸が 1.4. 5 g/L 生成していた。

【0114】〔実施例 7〕アナシティス・ニジュランス由来 PEP C 遺伝子を用いた有機酸の製造
アナシティス・ニジュランス由来の PEP C 遺伝子はその配列が既知 (GenBank Acession No. M11198, Gene, 38, 265-269 (1985)) であるため、実施例 1 (A) に示したように菌体を培養し、染色体 DNA を調製し、これを PCR の錠型として用いて、実施例 3 (D) で使用したプライマー (a-4, b-4) の代わりに、次の 2 つのプライマー (a-6, b-6) を用いて、PEP C をコードする遺伝子部分を増幅させることができる。以下、実施例 3 (D) と同様の手法で、アナシティス・*

配列：

GTNCTNACNG CNCAYCCNAC NGA

【0122】配列番号：2

配列の長さ：17

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

* ニジュランス由来の PEP C 遺伝子で組み換えた好気性コリネ型細菌を得ることができる。

【0115】(a-6) 5'-TTT CAT ATG GCT CGC TGT ATC TCT -3' (配列番号 16)

(b-6) 5'-TTT CCT GCA GGT CAA CCT GTA TTG CGC ATG -3' (配列番号 17)

【0116】得られたコリネ型細菌を実施例 4 の方法に従って培養したところ、コハク酸が 1.3. 5 g/L 生成していた。

10 【0117】〔実施例 8〕ニコチアナ・タバコム由来 PEP C 遺伝子を用いた有機酸の製造
ニコチアナ・タバコム由来の PEP C 遺伝子はその配列が既知 (GenBank Acession No. X59016, Plant Mol. Biol., 17, 535-539 (1991)) であるため、実施例 1

(A) に示したように菌体を培養し、染色体 DNA を調製し、これを PCR の錠型として用いて、実施例 3

(D) で使用したプライマー (a-4, b-4) の代わりに、次の 2 つのプライマー (a-7, b-7) を用いて、PEP C をコードする遺伝子部分を増幅させることができる。以下、実施例 3 (D) と同様の手法で、Nicotiana tabacum 由来の PEP C 遺伝子で組み換えた好気性コリネ型細菌を得ることができる。

【0118】(a-7) 5'-TTT CAT ATG GCG ACA CGG AGT TTG -3' (配列番号 18)

(b-7) 5'-TTT CCT GCA GGT TAA CCG GTA TTC TGC AGT -3' (配列番号 19)

【0119】得られたコリネ型細菌を実施例 4 の方法に従って培養したところ、コハク酸が 1.3. 0 g/L 生成していた。尚、実施例 6～8 では、乳酸や酢酸の生成量は減少していた。

【0120】

【発明の効果】本発明の方法によれば、効率よく、かつ高収率でコハク酸等の有機酸を製造することができる。

【0121】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：23

配列の型：核酸

40 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成ヌクレオチド）

配列の特徴

その他の情報：N はデオキシリノシンを示す。

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成ヌクレオチド）

配列の特徴

50 その他の情報：N はデオキシリノシンを示す。

23

24

配列：

TCNTGGATGG GNGGNGA

17

【0123】配列番号：3

* トポロジー：直鎖状

配列の長さ：8

配列の種類：ペプチド

配列の型：アミノ酸

*

配列：

Val Leu Thr Ala His Pro Thr Glu

1

5

【0124】配列番号：4

※ トポロジー：直鎖状

配列の長さ：6

10 配列の種類：ペプチド

配列の型：アミノ酸

※

配列：

Ser Trp Met Gly Gly Asp

1

5

【0125】配列番号：5

★生物名：ブレビバクテリウム・フラバム (Brevibacterium flavum)

配列の長さ：2760

株名：M J - 233

配列の型：核酸

配列の特徴

鎖の数：2本鎖

特徴を表す記号：CDS

トポロジー：直鎖状

20 存在位置：1..2760

配列の種類：Genomic DNA

★ 特徴を決定した方法：E

起源

配列

ATG ACT GAT TTT TTA CGC GAT GAC ATC AGG TTC CTC GGT CGA ATC CTC

48

Met Thr Asp Phe Leu Arg Asp Asp Ile Arg Phe Leu Gly Arg Ile Leu

1

5

10

15

GGT GAG GTA ATT GCG GAA CAA GAA GGC CAG GAG GTT TAT GAA CTG GTC

96

Gly Glu Val Ile Ala Glu Gln Glu Gly Gln Glu Val Tyr Glu Leu Val

20

25

30

20 GAA CAA GCG CGC CTG ACT TCT TTT GAT ATC GCC AAG GGC AAC GCC GAA

144

Glu Gln Ala Arg Leu Thr Ser Phe Asp Ile Ala Lys Gly Asn Ala Glu

35

40

45

35 ATG GAT AGC CTG GTT CAG GTT TTC GAC GGC ATT ACT CCA GCC AAG GCA

192

Met Asp Ser Leu Val Gln Val Phe Asp Gly Ile Thr Pro Ala Lys Ala

50

55

60

50 ACA CCG ATT GCT CGC GCA TTT TCC CAC TTC GCT CTG CTG GCT AAC CTG

240

Thr Pro Ile Ala Arg Ala Phe Ser His Phe Ala Leu Leu Ala Asn Leu

65

70

75

80

65 GCG GAA GAC CTC CAC GAT GAA GAG CTT CGT GAA CAG GCT CTC GAT GCA

288

Ala Glu Asp Leu His Asp Glu Leu Arg Glu Gln Ala Leu Asp Ala

85

90

95

85 GGC GAC ACC CCT CCG GAC AGC ACT CTT GAT GCC ACC TGG CTG AAA CTC

336

Gly Asp Thr Pro Pro Asp Ser Thr Leu Asp Ala Thr Trp Leu Lys Leu

100

105

110

100 AAT GAG GGC AAT GTT GGC GCA GAA GCT GTG GCG GAT GTG TTG CGT AAT

384

Asn Glu Gly Asn Val Gly Ala Glu Ala Val Ala Asp Val Leu Arg Asn

115

120

125

115 GCT GAG GTG GCG CCA GTT CTG ACT GCG CAC CCA ACT GAG ACT CGC CGC

432

Ala Glu Val Ala Pro Val Leu Thr Ala His Pro Thr Glu Thr Arg Arg

130

135

140

130 CGC ACT GTT TTT GAT GCG CAA AAG TCG ATC ACC ACC CAC ATG CGT GAA

480

25

26

Arg Thr Val Phe Asp Ala Gln Lys Trp Ile Thr Thr His Met Arg Glu
 145 150 155 160
 CGC CAC GCT TTG CAG TCT GCG GAG CCA ACC GCT CGT ACG CAA AGC AAG 528
 Arg His Ala Leu Gln Ser Ala Glu Pro Thr Ala Arg Thr Gln Ser Lys
 165 170 175
 TTG GAT GAG ATC GAA AAG AAC ATC CGC CGT CGC ATC ACC ATT TTG TGG 576
 Leu Asp Glu Ile Glu Lys Asn Ile Arg Arg Arg Ile Thr Ile Leu Trp
 180 185 190
 CAG ACC GCG TTG ATT CGT GTG GCC CGC CCA CGT ATC GAG GAC GAG ATC 624
 Gln Thr Ala Leu Ile Arg Val Ala Arg Pro Arg Ile Glu Asp Glu Ile
 195 200 205
 GAA GTA GGG CTG CGC TAC TAC AAG CTG AGC CTT TTG GAA GAG ATT CCA 672
 Glu Val Gly Leu Arg Tyr Tyr Lys Leu Ser Leu Leu Glu Glu Ile Pro
 210 215 220
 CGT ATC AAC CGT GAT GTG GCT GTT GAG CTT CGT GAG CGT TTC GGC GAG 720
 Arg Ile Asn Arg Asp Val Ala Val Glu Leu Arg Glu Arg Phe Gly Glu
 225 230 235 240
 GAT GTT CCT TTG AAG CCC GTG GTC AAG CCA GGT TCC TGG ATT GGT GGA 768
 Asp Val Pro Leu Lys Pro Val Val Lys Pro Gly Ser Trp Ile Gly Gly
 245 250 255
 GAC CAC GAC GGT AAC CCT TAT GTC ACC GCG GAA ACA GTT GAG TAT TCC 816
 Asp His Asp Gly Asn Pro Tyr Val Thr Ala Glu Thr Val Glu Tyr Ser
 260 265 270
 ACT CCA CGC GCT GCG GAA ACC GTG CTC AAG TAC TAT GCA CGC CAG CTG 864
 Thr Pro Arg Ala Ala Glu Thr Val Leu Lys Tyr Tyr Ala Arg Gln Leu
 275 280 285
 CAT TCC CTC GAG CAT GAG CTC AGC CTG TCG GAC CGC ATG AAT AAG GTC 912
 His Ser Leu Glu His Glu Leu Ser Leu Ser Asp Arg Met Asn Lys Val
 290 295 300
 ACC CCG CAG CTG CTT GCG CTG GCA GAT GCC GGG CAC AAC GAC GTG CCA 960
 Thr Pro Gln Leu Leu Ala Leu Ala Asp Ala Gly His Asn Asp Val Pro
 305 310 315 320
 AGC CGC GTG GAT GAG CCT TAT CGA CGC GCC GTC CAT GGC GTT CGC GGA 1008
 Ser Arg Val Asp Glu Pro Tyr Arg Arg Ala Val His Gly Val Arg Gly
 325 330 335
 CGT ATC CTC GCG ACG ACG GCT GAG CTG ATC GGC GAG GAC GCC GTT GAG 1056
 Arg Ile Leu Ala Thr Thr Ala Glu Leu Ile Gly Glu Asp Ala Val Glu
 340 345 350
 GGC GTG TGG TTC AAG GTC TTT ACT CCA TAC GCA TCC CCG GAA GAA TTC 1104
 Gly Val Trp Phe Lys Val Phe Thr Pro Tyr Ala Ser Pro Glu Glu Phe
 355 360 365
 TTA AAC GAT GCG TTA ACC ATC GAT CAT TCT CTG CGT GAA TCC AAT GAC 1152
 Leu Asn Asp Ala Leu Thr Ile Asp His Ser Leu Arg Glu Ser Asn Asp
 370 375 380
 ACT CTC ATC GCC GAT GAT CGT TTG TCT GTG CTG ATT TCT GCC ATC GAG 1200
 Thr Leu Ile Ala Asp Asp Arg Leu Ser Val Leu Ile Ser Ala Ile Glu
 385 390 395 400
 AGC TTC GGA TTC AAC CTC TAC TCA CTG GAT CTG CGC CAG AAC TCT GAG 1248
 Ser Phe Gly Phe Asn Leu Tyr Ser Leu Asp Leu Arg Gln Asn Ser Glu
 405 50 410 415

27

28

AGC TAC GAA GAC GTA CTC ACA GAG CTT TTC GAG CGT GCC CAA GTC ACC Ser Tyr Glu Asp Val Leu Thr Glu Leu Phe Glu Arg Ala Gln Val Thr 420 425 430	1296
GCA AAC TAC CGC GAG CTG TCT GAA GAG GAG AAG CTT GAG GTG CTG CTG Ala Asn Tyr Arg Glu Leu Ser Glu Glu Lys Leu Glu Val Leu Leu 435 440 445	1344
AAG GAA CTG CGC AGC CCT CGT CCG TTG ATC CCG CAC GGT TCA GAT GAA Lys Glu Leu Arg Ser Pro Arg Pro Leu Ile Pro His Gly Ser Asp Glu 450 455 460	1392
TAC AGC GAG GTC ACC GAC CGC GAG CTC GGT ATC TTC CGC ACC GCG TCG Tyr Ser Glu Val Thr Asp Arg Glu Leu Gly Ile Phe Arg Thr Ala Ser 465 470 475 480	1440
GAA GCT GTC AAG AAA TTC GGC CCA CGC ATG GTG CCT CAC TGC ATC ATT Glu Ala Val Lys Lys Phe Gly Pro Arg Met Val Pro His Cys Ile Ile 485 490 495	1488
TCC ATG ACA TCA TCG GTC ACC GAT GTG CTC GAG CCG ATG GTG TTG CTC Ser Met Thr Ser Ser Val Thr Asp Val Leu Glu Pro Met Val Leu Leu 500 505 510	1536
AAA GAA TTC GGC CTC ATC GCG GCC AAC GGC GAC AAT CCA CGC GGC ACC Lys Glu Phe Gly Leu Ile Ala Ala Asn Gly Asp Asn Pro Arg Gly Thr 515 520 525	1584
GTC GAT GTC ATC CCA CTG TTC GAA ACC ATC GAA GAC CTT CGA GCC GGC Val Asp Val Ile Pro Leu Phe Glu Thr Ile Glu Asp Leu Arg Ala Gly 530 535 540	1632
GCC GGA ATC CTC GGC GAA CTG TGG AAA ATT GAT CTC TAC CGC AAC TAC Ala Gly Ile Leu Gly Glu Leu Trp Lys Ile Asp Leu Tyr Arg Asn Tyr 545 550 555 560	1680
CTC CTG CAG CGC GAC AAC GTC CAG GAA GTC ATG CTC GGC TAC TCC GAT Leu Leu Gln Arg Asp Asn Val Gln Glu Val Met Leu Gly Tyr Ser Asp 565 570 575	1728
TCC AAC AAG GAT GGC GGA TAT TTC TCC GCA AAC TGG GCG CTT TAC GAC Ser Asn Lys Asp Gly Gly Tyr Phe Ser Ala Asn Trp Ala Leu Tyr Asp 580 585 590	1776
GCG GAA CTG CAG CTT GTC GAA CTA TGC CGA TCA GCC GGG GTC AAC GTT Ala Glu Leu Gln Leu Val Glu Leu Cys Arg Ser Ala Gly Val Asn Val 595 600 605	1824
CGC CTG TTC CAC GGC CGC GGT GGC ACC GTT GGA CGT GGT GGC GGA CCT Arg Leu Phe His Gly Arg Gly Gly Thr Val Gly Arg Gly Gly Pro 610 615 620	1872
TCC TAC GAT GCG ATT CTT GCC CAG CCC AAG GGG GCT GTC CAA GGT TCC Ser Tyr Asp Ala Ile Leu Ala Gln Pro Lys Gly Ala Val Gln Gly Ser 625 630 635 640	1920
GTG CGC ATC ACC GAG CAG GGC GAA ATC ATC TCA GCT AAG TAC GGC AAC Val Arg Ile Thr Glu Gln Gly Glu Ile Ile Ser Ala Lys Tyr Gly Asn 645 650 655	1968
CCT GAA ACT GCG CGC CGA AAC CTC GAG GCA CTG GTC TCA GCC ACG CTT Pro Glu Thr Ala Arg Arg Asn Leu Glu Ala Leu Val Ser Ala Thr Leu 660 665 670	2016
GAG GCA TCG CTT CTC GAC GTC TCT GAA CTC ACC GAT CAC CAA CGC GCG Glu Ala Ser Leu Leu Asp Val Ser Glu Leu Thr Asp His Gln Arg Ala	2064

29

30

675

680

685

2112

TAT GAC ATC ATG AGT GAG ATC TCT GAG CTC AGC CTG AAG AAG TAC ACC
 Tyr Asp Ile Met Ser Glu Ile Ser Glu Leu Ser Leu Lys Lys Tyr Thr
 690 695 700

2160

TCC TTG GTG CAC GAG GAT CAA CGC TTC ATC GAT TAC TTC ACC CAA TCC
 Ser Leu Val His Glu Asp Gln Gly Phe Ile Asp Tyr Phe Thr Gln Ser
 705 710 715 720

2208

ACA ACA CTG CAG GAG ATC GGA TCC CTC AAC ATC GGA TCC AGG CCT TCC
 Thr Thr Leu Gln Glu Ile Gly Ser Leu Asn Ile Gly Ser Arg Pro Ser
 725 730 735

2256

TCA CGC AAG CAA ACT TCC TCT GTG GAA GAT TTG CGA GCC ATC CCA TGG
 Ser Arg Lys Gln Thr Ser Ser Val Glu Asp Leu Arg Ala Ile Pro Trp
 740 745 750

2304

GTT CTT AGC TGG TCA CAG TCT CGT GTG ATG CTG CCA GGA TGG TTT GGT
 Val Leu Ser Trp Ser Gln Ser Arg Val Met Leu Pro Gly Trp Phe Gly
 755 760 765

2352

GTC GGA ACC GCA CTT GAA CAG TGG ATT GGA GAA GGG GAG CAA GCT ACC
 Val Gly Thr Ala Leu Glu Gln Trp Ile Gly Glu Gly Glu Gln Ala Thr
 770 775 780

2400

CAG CGC ATC GCC GAG CTG CAA ACA CTC AAC GAG TCC TGG CCA TTT TTC
 Gln Arg Ile Ala Glu Leu Gln Thr Leu Asn Glu Ser Trp Pro Phe Phe
 785 790 795 800

2448

ACC TCA GTG TTG GAC AAC ATG GCT CAG GTG ATG TCC AAG GCA GAG CTG
 Thr Ser Val Leu Asp Asn Met Ala Gln Val Met Ser Lys Ala Glu Leu
 805 810 815

2496

CGT TTG GCA AAG CTC TAT GCA GAC CTC ATC CCA GAT AGG GAA GTC GCC
 Arg Leu Ala Lys Leu Tyr Ala Asp Leu Ile Pro Asp Arg Glu Val Ala
 820 825 830

2544

GAG CGC GTC TAT TCC GTC ATC CAC GAG GAA TAT TTC CTG ACT AAA AAG
 Glu Arg Val Tyr Ser Val Ile His Glu Glu Tyr Phe Leu Thr Lys Lys
 835 840 845

2592

ATG TTC TGC GTG ATC ACC GGC TCC GAT GAT CTC CTT GAT GAC AAC CCA
 Met Phe Cys Val Ile Thr Gly Ser Asp Asp Leu Leu Asp Asn Pro
 850 855 860

2640

CTT CTG GCA CGC TCT GTC CAG CGT CGT TAC CCC TAC CTG CTT CCA CTC
 Leu Leu Ala Arg Ser Val Gln Arg Arg Tyr Pro Tyr Leu Leu Pro Leu
 865 870 875 880

2688

AAT GTG ATC CAG GTA GAG ATG ATG CGA CGC TAC CGA AAA GGC GAC CAA
 Asn Val Ile Gln Val Glu Met Met Arg Arg Tyr Arg Lys Gly Asp Gln
 885 890 895

2736

AGC GAG CAA GTG TCC CGC AAT ATT CAG CTG ACA ATG AAC GGT CTT TCC
 Ser Glu Gln Val Ser Arg Asn Ile Gln Leu Thr Met Asn Gly Leu Ser
 900 905 910

2760

ACT GCA CTG CGC AAC TCC GGC TAG
 Thr Ala Leu Arg Asn Ser Gly
 915

【0126】配列番号：6

配列の長さ：30

鎖の数：一本鎖

配列

* 配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

31

32

30

【0127】配列番号：7 配列の長さ：30 鎖の数：一本鎖 配列 TTTCTCGAGC GCATTACCTC CTTGCTACTG	* 配列の型：核酸 トポロジー：直鎖状 配列の種類：他の核酸（合成DNA）
【0128】配列番号：8 配列の長さ：27 鎖の数：一本鎖 配列 TTTGAATTG ATATCAAGCT TGCACATCAA	※ 配列の型：核酸 トポロジー：直鎖状 配列の種類：他の核酸（合成DNA）
【0129】配列番号：9 配列の長さ：27 鎖の数：一本鎖 配列 TTTGGTACCG ACTTAGATAA AGGTCTA	★ 配列の型：核酸 トポロジー：直鎖状 配列の種類：他の核酸（合成DNA）
【0130】配列番号：10 配列の長さ：30 鎖の数：一本鎖 配列 TTTCTCGAGT GCTGGTAAAA CAACTTT	☆ 配列の型：核酸 トポロジー：直鎖状 配列の種類：他の核酸（合成DNA）
【0131】配列番号：11 配列の長さ：54 鎖の数：一本鎖 配列 TTTGGTACCG ATAGCTTACT CCCCATCCCC	◆ 配列の型：核酸 トポロジー：直鎖状 配列の種類：他の核酸（合成DNA）
【0132】配列番号：12 配列の長さ：27 鎖の数：一本鎖 配列 TTTGGATCCC AACATATGAA CACCTCCTT TTATCCGCTC ACAATTCCAC ACAT	配列の型：核酸 トポロジー：直鎖状 配列の種類：他の核酸（合成DNA）
【0133】配列番号：13 配列の長さ：33 鎖の数：一本鎖 配列 TTTCATATGA CTGATTTTT ACCGGAT	配列の型：核酸 トポロジー：直鎖状 配列の種類：他の核酸（合成DNA）
【0134】配列番号：14 配列の長さ：24 鎖の数：一本鎖 配列 TTTCCTGCAG GCTAGCCGGA GTTGCGCACT GCA	配列の型：核酸 トポロジー：直鎖状 配列の種類：他の核酸（合成DNA）
【0135】配列番号：15 配列の長さ：30 鎖の数：一本鎖 配列 TTTCATATGT CGTCGTTGAA CCTG	配列の型：核酸 トポロジー：直鎖状 配列の種類：他の核酸（合成DNA）
【0136】配列番号：16 配列の長さ：24 鎖の数：一本鎖 配列 TTTCCTGCAG GTCACCCGCT ATTCCGCAGC	配列の型：核酸 トポロジー：直鎖状 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

33

34

24

TTTCATATGG CTCGCTGTAT CTCT

【0137】配列番号：17

配列の長さ：30

鎖の数：一本鎖

配列

TTTCCTGCAG GTCAACCTGT ATTGCCCATG

【0138】配列番号：18

配列の長さ：24

鎖の数：一本鎖

配列

TTTCATATGG CGACACGGAG TTTG

【0139】配列番号：19

配列の長さ：30

鎖の数：一本鎖

配列

TTTCCTGCAG GTTAACCGGT ATTCTGCAGT

30

24

* 配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

※ 配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

※ 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

30

フロントページの続き

(51) Int. Cl. * 識別記号

F I

(C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:13)

(C 1 2 N 15/09 Z NA

C 1 2 R 1:13)

(72) 発明者 湯川 英明

茨城県稲敷郡阿見町中央八丁目3番1号

三菱化学株式会社筑波研究所内

30